

THESIS

MUNICH

1965

EINE METHODE ZUR ABTRENNUNG  
HEPARINS VON DEN PLASMAPROTEINEN  
UND SEINE QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Kurt Winkler







Aus der  
Medizinischen Poliklinik der Universität München  
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

---

Eine Methode zur Abtrennung Heparins von  
den Plasmaproteinen und seine quantitative  
Bestimmung

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und  
einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Kurt Winkler  
aus München

München 1965

---

Dissertations-Druckerei Charlotte Schön, München 23,  
Belgradstr. 11, Tel. 361402

---

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. ZÖLLNER  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. SEITZ  
Dekan: Prof. Dr. O. HUG

Tag der mündlichen Prüfung: 9. 2. 1965

# Inhaltsübersicht

|                                                                         | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                                           |       |
| II. Die Heparinbestimmung                                               |       |
| 1. Theoretische Grundlagen zum R'ase-Test                               | 6     |
| 2. Der optische Test                                                    | 7     |
| 3. Die Bandspreizung                                                    | 7     |
| 4. Der Meßvorgang                                                       | 9     |
| a) Das Spreizen                                                         | 9     |
| b) Der Test                                                             | 11    |
| c) Die Auswertung                                                       | 13    |
| 5. Das Substrat                                                         | 13    |
| 6. Die Arbeitsbedingungen des R'ase-Tests                               | 14    |
| a) Das Wasserstoffionenmilieu                                           | 14    |
| b) Die Ionenstärke                                                      | 15    |
| c) Die R'ase-Konzentration                                              | 15    |
| d) Die R'at-Konzentration                                               | 18    |
| e) Die optimalen Bedingungen für den R'ase-Test                         | 18    |
| III. Die Heparindarstellung                                             |       |
| 1. Versuche zur Abtrennung von den Proteinen                            | 20    |
| 2. Die Fällung mit CPC                                                  | 21    |
| a) Die eiweißfreie Fällung                                              | 21    |
| b) Ausschütteln des CPC mit Chloroform                                  | 22    |
| c) Ausschütteln des CPC präsenzte Heparin                               | 23    |
| d) Abheben des Heparin von der Chloroformphase                          | 23    |
| e) Das pH-Optimum der CPC-Fällung                                       | 24    |
| f) Die CPC-AA-Fällung                                                   | 25    |
| aa) AA-Löslichkeit in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration           | 26    |
| bb) Die AA-Heparinfällung aus Kochsalzlösungen / pH-Optimum der Fällung | 26    |
| cc) Fällungsschema                                                      | 28    |
| g) Die CPC-Heparinfällung in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration  | 28    |
| h) Die Dreifach-Fällung: AA-CPC-AA                                      | 29    |
| i) Genaue Beschreibung der Isolation in Plasma eingesetzten Heparins    | 30    |
| k) Schema der Isolation in Plasma eingesetzten Heparins                 | 33    |
| IV. Endogenes Heparin                                                   |       |
| 1. Der Anreicherungsversuch                                             | 34    |

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 2. Der ungeklärte Störeffekt                | 35 |
| 3. Die Ausbeute beim Anreicherungsverfahren | 36 |
| 4. Endogenes Heparin                        | 36 |
| V. Diskussion                               | 37 |
| VI. Zusammenfassung                         | 38 |
| VII. Reagenzien                             | 40 |
| VIII. Schrifttum                            | 42 |

#### Liste der verwandten Abkürzungen

|       |                             |
|-------|-----------------------------|
| AA    | 5-Aminoacridin-hydrochlorid |
| CPC   | Cetyl-pyridiniumchlorid     |
| Hep.  | Heparin                     |
| R'ase | Ribonuclease                |
| R'at  | Ribonucleat                 |

## I. Einleitung

Vorliegende Arbeit ist die Fortsetzung einer Reihe von Untersuchungen, die von der Entdeckung ausgingen, daß die Aktivität der Ribonuclease <sup>x)</sup> durch Heparin gehemmt wird, während andere Verbindungen aus der Reihe der Mucopolysaccharide diese Eigenschaft nicht, oder in sehr viel geringerem Maße haben. Diese Eigenschaft, die es erlaubt, Heparin von verwandten Verbindungen zu unterscheiden, wurde zum Vorwurf für Arbeiten an einer spezifischen Bestimmungsmethode für Heparin, in der Hoffnung damit eines Tages dem Problem des endogenen Heparins näher zu kommen. Für diese Fragestellung sollte die Nachweismethode, wie sie Zöllner und Lorenz (1) und später Zöllner und Hobom (2) ausgearbeitet hatten, empfindlicher, einfacher und rascher durchführbar gemacht werden.

Die zweite Voraussetzung dieser Arbeit war die von Ch. Burger (3) angegebene Methode der Heparinisolierung aus dem Plasma. Für die Ansprüche, die der Heparintest mit Ribonuclease (im weiteren kurz R'ase-Test) bezüglich der Reinheit, insbesondere von Proteinen, stellt, mußte sie allerdings erweitert und verfeinert werden.

So ist der Hauptteil dieser Arbeit dem Ausbau und der Adaptation einer bekannten Fällungsmethode an eine bekannte Nachweismethode gewidmet, wodurch schließlich ein Zugang zum endogenen Heparin möglich wird.

---

<sup>x)</sup> Alle speziellen Reagenzien sind am Ende der Arbeit, auf Seite 40 aufgeführt.

## II. Die Heparinbestimmung

### 1. Theoretische Grundlagen zum R'ase-Test

Das Heparinmolekül ist durch seine Affinität zu dem Ferment Ribonuclease (R'ase) in der Lage, das Substrat Ribonucleinsäure (R'at) von seinen Bindungsstellen am Enzym zu verdrängen und dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung:  $R'at \xrightarrow{R'ase} \text{Nucleotide}$  herabzusetzen. Der mathematische Ausdruck für solche eine kompetitive Hemmung lautet:

$$\frac{v_0}{v_i} = 1 + K \frac{[I]}{K' + [S]}$$

wobei  $v_0$  die Geschwindigkeit der ungehemmten Reaktion,  $v_i$  die der gehemmten,  $[I]$  die Konzentration des Inhibitors (Hemmstoff, speziell Heparin) und  $[S]$  die Substratkonzentration bedeuten.  $\frac{v_0}{v_i}$  hängt somit linear von der Heparinkonzentration ab. Den Beweis für die Zuverlässigkeit der Formel innerhalb gewisser Grenzen liefert das Experiment, bei welchem  $\frac{v_0}{v_i}$  bei verschiedenen Heparinkonzentrationen gemessen wird. Es ergibt sich eine Gerade, die bei  $[I] = 0$  durch den Punkt  $P(0/1)$  geht und deren Steigung, wie aus der Formel ersichtlich ist, von  $[S]$  abhängt. Diese Steigung ist ein Maß für die Empfindlichkeit der Heparinbestimmung aus  $\frac{v_0}{v_i}$ ; wie weit auch noch andere Faktoren die Empfindlichkeit beeinflussen, wird in dem Kapitel "Die Arbeitsbedingungen des R'ase-Tests" untersucht.

Neben der Ribonuclease werden durch Heparin noch einige andere Fermente gehemmt, die sich zu einer quantitativen Bestimmung eignen würden. Die R'ase jedoch wird mit großer Spezifität von Heparin und nicht von anderen, im Körper vorkommenden Mucopolysacchariden gehemmt, so daß die Bestimmung mit dem R'ase-Test eine quantitative und qualitative Aussage erlaubt.

## 2. Der optische Test

Im Gegensatz zu Hobom, der aus der Zunahme der sauren Valenzen, die bei der Spaltung der cyclischen 2',3'-Phosphate (Zwischenprodukten des Ribonucleinsäureabbaus durch die Ribonuclease) entstehen, die Geschwindigkeiten  $v_0$  und  $v_i$  für den R'ase-Test bestimmt hatte, wurden die Untersuchungen, die dieser Arbeit zugrundeliegen, spektrophotometrisch durchgeführt, wobei die Extinktionsabnahme durch die Verringerung der Substratkonzentration den Reaktionsverlauf anzeigt.

Das optische Verfahren hat gegenüber dem titrimetrischen den Vorteil, daß es Messungen in jedem pH-Bereich mit gleichbleibender Genauigkeit erlaubt und damit die Möglichkeit bietet, in einem für den R'ase-Test günstigeren pH zu arbeiten; zudem ist es handlicher und kann mit geringerem Zeitaufwand durchgeführt werden.

Die Messanordnung bestand aus einem Spektralphotometer: Beckman "DU", an welches ein Schreiber gekoppelt war (Hartmann und Braun "Linecomp"), der bei 50 mV seinen Vollausschlag bei einer Schreibbreite von 25 cm hat. Dazu gehörten ein Akku-stabilisiertes Netzgerät und ein Multiplier.

## 3. Die Bandspreizung

Der geringe Lichtdurchlässigkeitsunterschied zwischen cyclischem Cytidin 2',3'-Phosphat und Cytidin 3'-Monophosphat oder zwischen Ribonucleinsäure und ihren Abbauprodukten durch die R'ase stellte hinsichtlich des R'ase-Hemmtests ein schwieriges Problem dar: einerseits ist es bei den geringen Substrat- und Ferment-

Konzentrationen, die für eine empfindliche Messung (0,1% Hep./Ansatz) notwendig sind, schon an sich schwierig, die Extinktionsdifferenz ( $\Delta E$ ) zu messen, andererseits dauern die einzelnen Versuche bis zum Erreichen eines messbaren  $\Delta E$  recht lange, was wiederum an die Konstanz der Meßanordnung eine nur sehr schwer erreichbare Forderung stellt. Zur Verbesserung des Meßeffektes kann man zwar die Registrierung der Extinktion in den Bereich einer möglichst geringen Gesamtextinktion verlegen, wo man bei geringstem  $\Delta E$  die größten Ausschläge hat, brauchbare Ergebnisse erzielt man aber erst, wenn man die Skala spreizt, d.h. wenn man den Messbereich auf die gesamte Schreibbreite ausdehnt. Dazu nimmt man zwei Flüssigkeiten, deren Extinktionen den Messbereich möglichst knapp einschließen und stellt die eine als Nullwert, die andere als 100 % der Transmission ein. Die so erreichbare Vergrößerung der Abbildung hängt naturgemäß von der Qualität der verwendeten Meßgeräte ab. Mit den oben beschriebenen Geräten ließ sich auf die beschriebene Weise eine Verstärkung von 1:10 bis 1:20 erzielen.

Schwierigkeiten bereitet das Auffinden geeigneter Flüssigkeiten, die sich als 0 und 100 %-Werte verwenden lassen. Lösungen ändern durch Verdampfen während des Versuches ihre Konzentration (und ihre Extinktion) und Lösungsmittel mit passenden Extinktionen sind mühevoll zu finden; vor allem müssen bei jeder Konzentrationsänderung im Testansatz wieder neue gewählt werden.

Als sehr geeignet erwiesen sich statt dessen verstellbare Kuvettenblenden, die sich relativ leicht herstellen lassen:

Am besten besorgt man sich Messing 4-Kant-Rohre 12 x 12 mm und 10 x 10 mm, die sich ineinander stecken lassen. Man verschließt beide Rohre einseitig, das größere am besten, indem man aus einer Seite einen Lappen bildet, den man umschlägt und

verlötet, das kleinere durch eine Schraubenmutter, die man einpaßt und ebenfalls verlötet. Durch beide Rohre bricht man je zwei rechteckige Fenster so, daß bei Kongruenz der Lichtstrahl des Photometers nicht genindert wird und durch Verschieben der beiden Rohre ein völliges Absperrern des Lichtweges möglich wird. Durch eine Schraube, die durch den Deckel des äußeren Rohres die Mutter des inneren Rohres faßt, läßt sich dann kontinuierlich jeder Extinktionswert zwischen 0 und  $\infty$  einstellen. Wenn es die Höhe des Kuvettengenäuses erlaubt, sollte man das äußere Rohr so lang nehmen, daß man noch eine Spiralfeder zwischen die beiden Blendenrohre einfügen kann, damit sie sich in keiner Richtung verschieben können und sich auch die Schraube nicht unbeabsichtigt verstellt. Der Abstand der Fenster beider Rohre vom unteren Rand der Blende ist bestimmt durch den Abstand des Photometer-Lichtspaltes vom Boden des Kuvettengenäuses; der Abstand der Fenster vom oberen Rand des inneren Rohres sollte so groß sein, daß nicht die Schraube im Fenster sichtbar wird, also mindestens Fensternöhe betragen. Beim Ausfeilen der oberen und unteren Fensterbegrenzungen sollte man darauf achten, daß sie im Winkel und parallel sind, da nur dann durch den Querspalt der Blende aus dem senkrechten Lichtspalt des Photometers immer gleiche Flächen ausgeschnitten werden, auch wenn der Kuvettenschlitten die Blenden nicht immer genau an die gleiche Stelle vor den Spalt bringt. (s. Abb. 1)

Der Beweis, daß eine solche Bandspreizung zulässig ist, d.h. daß sie einen linear verstärkten Meßeffect ergibt, wurde dadurch erbracht, daß unter sonst völlig konstanten Versuchsbedingungen die Fermentkonzentration im R'ase-Test verändert wurde. Dabei gab die streng lineare Abhängigkeit der gespreizt registrierten Reaktion von der Fermentkonzentration das Recht, eine lineare Verstärkung anzunehmen.

#### 4. Der Meßvorgang

##### a) Das Spreizen

Man pipettiert in eine Kuvette:

- 1 ml Substrat
- 1 ml Puffer
- 1 ml H<sub>2</sub>O

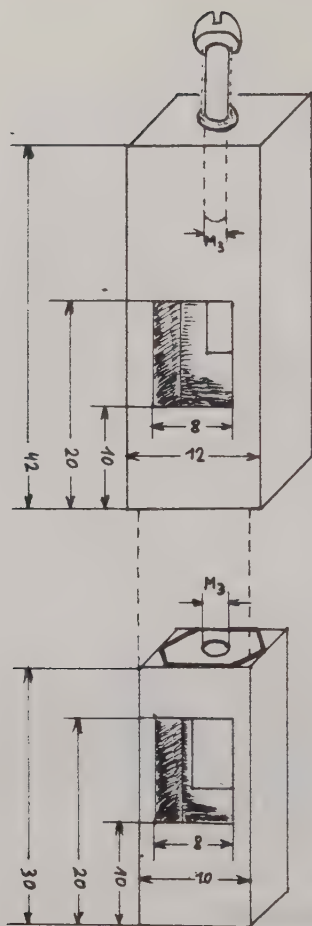


Abb. 1. Skizze der verstellbaren Kuvettenblende

(Hep. und R'ase fallen in den verwendeten Konzentrationen bei 300 m $\mu$  nicht ins Gewicht; R'at und Puffer in der Konzentration, wie man sie für den ganzen Versuch gewählt hat.) Man bestimmt mit dem Photometer am Schreiber die Transmission der Probe bei 300 m $\mu$  gegen Luft. (Wegen der schärferen Ausblendung der eingestellten Wellenlänge aus dem Spektrum empfiehlt es sich, dabei - wie insbesondere später bei den Tests - mit möglichst kleinem Spalt (0,1 bis 0,2 mm) zu arbeiten. Dann stellt man die eine der beiden Kuvettenblenden auf eine etwas geringere, die andere auf eine etwas höhere Transmission ein und macht sie danach zum 0% bzw. zum 100%-Wert der folgenden Messungen. Beginnt der Zeiger des Schreibers zu zittern, so ist die Spreizung zu stark und man eicht dann beispielsweise die Meßanordnung so, daß der Schreiber beim Verschieben der einen Blende 10%, bei der anderen 90% anzeigt usw.

#### b) Der Test

Man soll während einer ganzen Testreihe die Photozelle weder vom Lichtweg absperren, noch beim Öffnen des Kuvettengehäuses starkes Licht einfallen lassen (in mäßig erleuchtetem Raum arbeiten!), da beides die Photozelle irritiert und die folgende Messung beeinflusst.

Nachdem man die Testkuvette mit

- 1 ml Substrat
- 1 ml Puffer
- 1 ml Heparin (Wasser)

in den Lichtweg geschoben hat, überzeugt man sich noch einmal, ob die Extinktion der Testkuvette in den eingestellten Meßbereich fällt; danach bringt man

auf ein Rührstäbchen <sup>x)</sup> 0,02 ml R'ase, die man in der Kuvette durch kurzes Verrühren verteilt. Gleichzeitig schaltet man den Schreiber an (Vorschub ca 15 cm/min), um auf diese Weise den genauen Zeitpunkt  $t_0$  des Reaktionsbeginnes zu markieren. Möglichst rasch setzt man dann den Deckel auf das Kuvettengehäuse, um den Anfangsteil der Kurve zu erhalten.

Die Testdauer betrug meist zwischen 1/2 und 3 min. Nach jedem Test muß man die Einstellung überprüfen und hat dabei gleichzeitig eine Kontrolle, ob die letzte Messung auch zuverlässig war.

Bei jeder neuen Meßreihe sollte man auch eine neue Eichkurve machen, oder wenigstens einen Eichwert mitlaufen lassen, da das Substrat je nach Alter der Lösung nicht ganz gleiche Hemmergebnisse liefert.

Will man in einer Testreihe die Zusammensetzung des Testgemisches variieren, so kann man die veränderte Ausgangsextinktion  $E_0$  durch Verändern des Lichtspaltes wieder in den Meßbereich rücken. (Dabei ist zu bedenken, daß mit dem Spalt auch der Ausschnitt aus dem Lichtspektrum verändert wird.)  $E_0$  sollte dabei immer an der gleichen Stelle der Skala liegen, da man sonst wegen der logarithmischen Verzerrung der E-Skala falsche Meßergebnisse bekommt. Zur Kontrolle der 0%- und 100%-Einstellung muß eine solche Verschiebung des Meßbereiches nach jedem Test wieder rückgängig gemacht werden.

---

<sup>x)</sup> Die Rührstäbchen kann man aus 3 mm Ø starken PVC-Stäben anfertigen, indem man etwa 12 cm lange Stücke abzwickt, das eine Ende über einer kleinen Flamme erweicht und mit einer Flachzange breitdrückt und abbiegt.

### c) Die Auswertung

Man erhält eine Reihe von Kurven  $E/t$ , deren Steigung mit zunehmender Heparinkonzentration abnimmt. Entsprechende Kurvenstücke liegen im Bereich entsprechender  $\Delta E$  von der Ausgangsextinktion  $E_0$  aus gerechnet.  $E_0$  erhält man durch Extrapolation des Kurvenverlaufes auf  $t_0$  (oder durch Messung vor Zugabe der R'ase, wobei man den Fehler macht, die Extinktionsänderung durch die R'ase unberücksichtigt zu lassen). Die Reaktionszeiten verhalten sich umgekehrt wie die Reaktionsgeschwindigkeiten und der Quotient  $v_0/v_1$  liefert ein Maß für die Hemmung, das proportional der zugesetzten Heparinmenge ist.

### 5. Das Substrat

Nach den Angaben Hoboms wurden als Substrat zunächst cyclisches Cytidin- und Uridin- 2',3' Phosphat verwendet, die durch Ribonuclease zu den entsprechenden Monophosphaten gespalten werden. Um für die spektrophotometrische Verfolgung der Spaltungsreaktion die günstigsten Voraussetzungen zu schaffen, wurden die UV-Absorptionsspektren der cyclischen- und der Monophosphate zwischen 200 und 300 m $\mu$  gemessen und daraus die Differenzabsorptionskurve aufgestellt.

Es stellte sich heraus, daß die Lichtabsorption in den gemessenen Bereichen weitgehend von pH und Ionenstärke unabhängig ist, so daß sich also die für den R'ase Test des Heparins ausschlaggebende Extinktionsdifferenz zwischen cyclischem Phosphat und Monophosphat nicht beeinflussen läßt. Wegen der geringen Unterscheidbarkeit durch ihre Lichtabsorption waren weder das cyclische Cytidin- noch das cyclische Uridinphosphat besonders für den optischen R'ase-Test

geeignet, sodaß in den weiteren Versuchen mit Ribonucleinsäure gearbeitet wurde, die etwas günstigere Voraussetzungen bietet.

## 6. Die Arbeitsbedingungen des R'ase-Tests

### a) Das Wasserstoffionenmilieu

Testansatz:

|               |                                                                  |
|---------------|------------------------------------------------------------------|
| 0,02 ml R'ase | (30γ/ml)                                                         |
| 1,0 ml Hep    | (1γ/ml)                                                          |
| 1,0 ml R'at   | (0,5 mg/ml, in Puffer gelöst)                                    |
| 1,0 ml Puffer | (Acetatpuffer 0,1 M pH 5,9-5,0-3,9<br>Citratpuffer 0,1 M pH 2,8) |

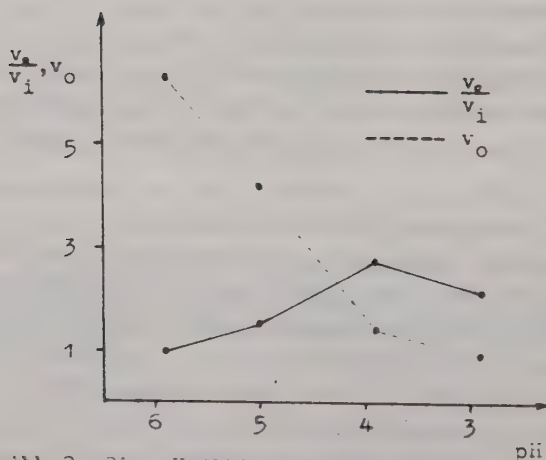


Abb.2. Die pH-Abhängigkeit der R'ase Hemmung durch Heparin (1γ)

Bei pH 5,9 ist die Hemmwirkung einer bestimmten Heparinkonzentration am geringsten; sie nimmt dann mit fallendem pH zu, um jenseits von etwa pH 4 wieder abzunehmen. Dabei dürfte es sich jedoch um ein Scheinmaximum handeln, hervorgerufen durch die Säureempfindlichkeit des Heparins, das bei pH-Werten unter 4 offenbar sehr rasch zerstört wird. (s. Abb. 2.)

#### b) Die Ionenstärke

Testansatz:

1 ml NaCl (0-4M)  
1 ml Hep (1 $\gamma$ /ml)  
1 ml R'at (125 $\gamma$ /ml)  
0,02 ml R'ase (200 $\gamma$ /ml)

Die Kinetik der R'ase und der Heparin-gehemmten R'ase ist in komplexer Weise von der Salzkonzentration abhängig, da Enzym, Substrat und Inhibitor Salze bilden können, die die Reaktion ganz unterschiedlich beeinflussen. Für den Bereich geringster Salzkonzentrationen (bis zu einer Konz. von etwa 0,02 M im Testansatz) gilt, daß die Hemmwirkung des Heparins mit steigender Salzkonzentration abnimmt. Gleichsinnig nimmt auch  $\frac{dE}{dt}$  ab, wobei die Frage offen bleibt, ob es sich um eine reale Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit oder um eine Verringerung des gesamten  $\Delta E$  bei steigender Ionenstärke oder vielleicht auch nur um einen Anfangseffekt handelt. Jedenfalls geht daraus hervor, daß Eichansätze und Bestimmungsansätze sehr genau die gleiche Salzkonzentration haben müssen.

#### c) Die R'ase-Konzentration

Testansatz:

0,02 ml R'ase (20-300 $\gamma$ /ml)  
1,0 ml Hep (1 $\gamma$ /ml)  
1,0 ml R'at (500 $\gamma$ /ml)  
1,0 ml Puffer (Acetatpuffer 0,1 M, pH 5,0)

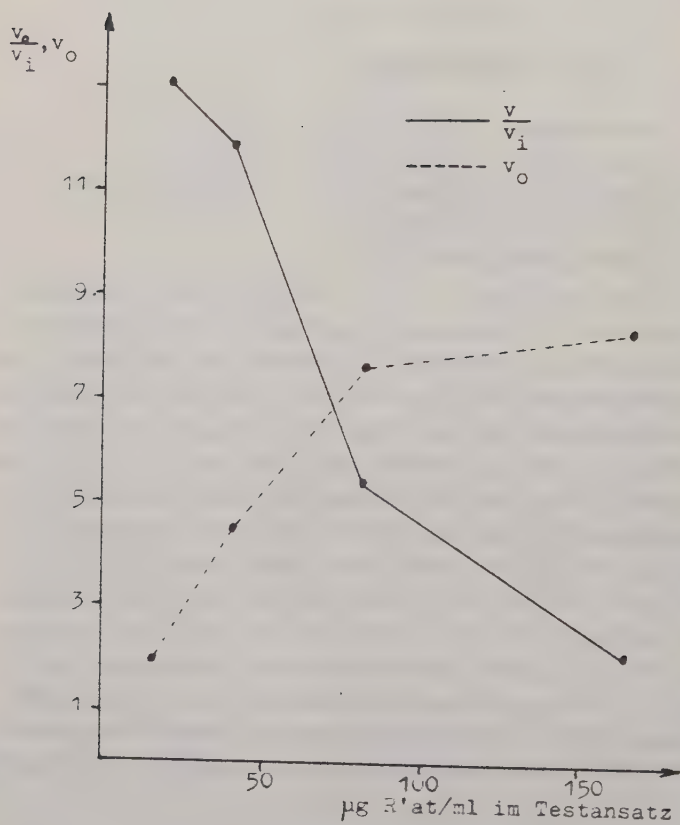


Abb.3. Die Substratabhängigkeit der R'ase Hemmung durch Heparin(1γ)

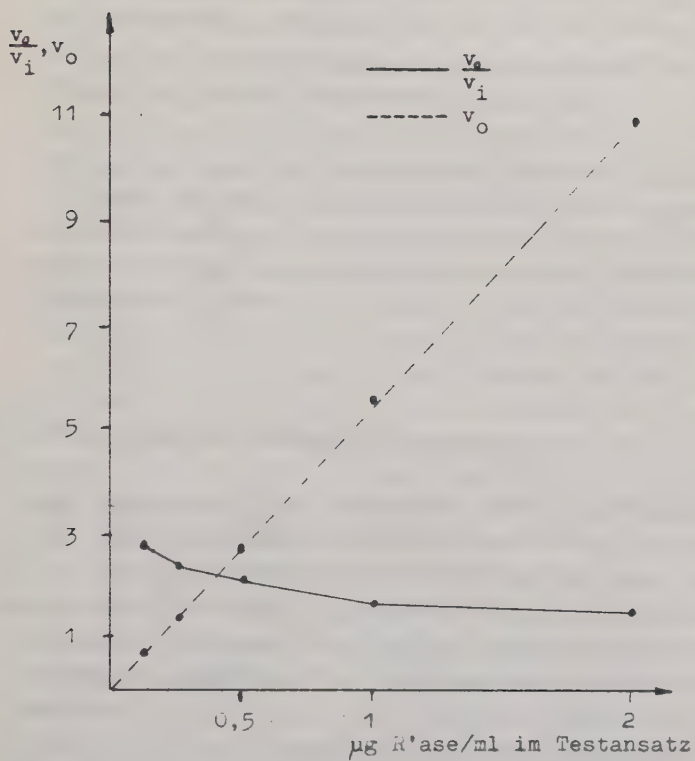


Abb.4. Die Enzymabhängigkeit der R'ase Hemmung durch Heparin(1%)

#### d) Die R'at-Konzentration

##### Testansatz:

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| 0,02 ml R'ase | (75 $\gamma$ /ml)          |
| 1,0 ml Hep    | (1 $\gamma$ /ml)           |
| 1,0 ml R'at   | (60-500 $\gamma$ /ml)      |
| 1,0 ml Puffer | (Acetatpuffer 0,1 M; pH 5) |

Die letzten beiden Versuche ergaben, daß die Hemmwirkung des Heparins bei fallender R'ase- und insbesondere bei fallender R'at-Konzentration steigt. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit der oben angegebenen Näherungsformel für die kompetitive Hemmung überein, bei der die R'at-Konzentration ja im Nenner auftritt, während die R'ase-Konzentration, die nicht in die Formel eingeht, auch nur einen sehr geringen Einfluss auf  $\frac{v_0}{v_i}$  ausübt. (s. Abb. 3 u. 4.)

#### e) Die optimalen Bedingungen für den R'ase-Test

Die Hemmeffekte potenzieren sich zwar, wenn man für alle Variablen optimale Werte ansteuert, aber dabei sind verschiedene Umstände zu beachten.

Eine Steigerung der Empfindlichkeit durch Ausnutzung der im sauren Milieu zunehmenden Hemmwirkung findet ihre Grenze in der Säurelabilität des Heparins, die sich bei einem pH unter 4 schon in den kurzen Testzeiten störend auswirkt, die das Heparin dem sauren Milieu ausgesetzt ist. Dazu sinkt mit fallendem pH auch die Reaktionsgeschwindigkeit  $v_0$ , was eine längere Versuchsdauer mit den Nachteilen durch die Inkonzanz der Meßgeräte bedingt.

Was oben über die Nachteile einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit gesagt wurde, gilt in noch viel höherem Grade für den Versuch, die Hemmwirkung durch

Verminderung der R'ase-Konzentration zu verbessern, da hier im Vergleich zu den starken Einbußen an Reaktionsgeschwindigkeit nur eine geringe Zunahme' von  $\frac{v_o}{v_i}$  zu erwarten ist.

Die Ionenstärke sollte nach dem oben gesagten möglichst klein sein; sie ist schließlich nur noch von der Pufferstärke abhängig, die so gewählt werden muß, daß die bei der Reaktion entstehenden sauren Valenzen ausreichend abgepuffert werden.

Die ausschlaggebende Verstärkung des nemmeffektes erzielt man durch eine Verminderung der R'at-Konzentration. Bei einer R'ase-Konzentration von 1,6  $\gamma$ /ml führt eine solche Verminderung der Substratkonzentration zwar schon bei 80  $\gamma$  R'at/ml dazu, daß Substrat nicht mehr im Überschuß vorhanden ist (erkennbar an dem Abfall von  $v_o$ , das, solange Substrat im Überschuß vorhanden ist, von dessen Konzentration unabhängig sein muß). Aber bei der Art der Bestimmung, die von der für ein bestimmtes  $\Delta E$  erforderlichen Zeit ausgeht, spielt es keine Rolle, ob das Verhältnis  $\frac{E}{t}$  ein lineares oder logarithmisches ist. So hat man in der Verminderung der R'at-Konzentration noch das wirksamste Mittel zur Steigerung der Empfindlichkeit in der Hand. Letztlich wird auch hier das abnehmende  $v_o$  und die damit verbundene höhere Störanfälligkeit eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit des Verfahrens unmöglich machen.

Für die meisten der hier durchgeführten Versuche wurden in eine Kuvette eingesetzt:

|               |                                             |
|---------------|---------------------------------------------|
| 1,0 ml R'at   | (125 bis 250 $\gamma$ /ml in Puffer gelöst) |
| 1,0 ml Hep    | (0,1 bis 10 $\gamma$ /ml)                   |
| 1,0 ml Puffer | (Acetattpuffer 0,1 M, pH 5)                 |
| 0,02 ml R'ase | (150 $\gamma$ /ml (75 bis 200 $\gamma$ ))   |

### III. Die Heparindarstellung

#### 1. Versuche zur Abtrennung von den Proteinen

Bringt man durch Aminoacridin (AA) aus dem Plasma gefälltes Heparin auf ein pH zwischen 3 und 6, so tritt eine Trübung durch ausfallendes Protein auf. Da der R'-ase-Test aber gerade in diesem H<sup>+</sup>-Ionenmilieu seine größte Empfindlichkeit zeigt, mußte versucht werden, das störende-Eiweiß zu beseitigen. Aus der grossen Anzahl vergeblicher Bemühungen werden hier nur einige typische kurz aufgeführt.

Zunächst wurde geklärt, ob das störende Protein mit AA einen unlöslichen Komplex bildet oder ob es sich als Kopräcipitation aus dem Niederschlag durch Auswaschen entfernen läßt. Jedoch weder mit Puffer, noch mit AA-Lösungen ließ sich das Eiweiß auswaschen.

Ein anderer Versuch, das Eiweiß durch Fällung an seinem isoelektrischen Punkt zu entfernen, schlug fehl, da Heparin dabei quantitativ mitgefällt wird, wie sich mit radioaktiv markiertem Heparin-S<sup>35</sup> leicht nachweisen ließ. Dabei wurde Heparin sogar noch an das bereits denaturierte Protein gebunden, wenn es nach der Fällung zugesetzt wurde.

In wieder anderen Experimenten wurde versucht, die Mitfällung von Eiweiß bei der AA-Hep. Fällung durch Na-Desoxycholat oder Trichloressigsäure zu verhindern. Na-Desoxycholat soll nach einer Angabe von Warburg die Ausbildung größerer Micellen bei der Protein-Denaturierung verhindern und Essigsäure soll nach Gibian (5) die Fällung des mit Heparin einen Komplex bildenden Proteins auch noch bei sehr niedrigem pH verhindern. Das Ergebnis war in beiden Fällen unbefriedigend.

Auch der Eiweißabbau durch Pronase, einem sehr aktiven proteolytischen Ferment, führte nicht zu dem gewünschten Ziel, Heparin so von den Plasmaproteinen zu befreien, daß es in den R'-ase-Test eingesetzt werden konnte.

Eine ganze Reihe von Versuchen, das störende Protein durch eine im Anschluß an die AA-Fällung vorgenommene zweite Fällung zu entfernen, scheiterten ebenfalls. N-Octylamin (4) und Brucin (4)

fällten offenbar ähnliche Eiweißfraktionen wie AA; Azur und Methylenblau fällten Heparin nicht quantitativ und eine mehrfache Eiweißfällung nach Sevag an der Grenzfläche mit den verschiedensten organischen Lösungsmitteln lieferte zwar zunehmend eiweißärmere, aber keine eiweißfreien Lösungen.

Erst im Cetyl-Pyridiniumchlorid (6) zeigte sich ein Reagens, das Heparin quantitativ fällt, das durch AA mitgefällte Eiweiß aber nicht wieder ausfällt.

## 2. Die Fällung mit Cetyl-Pyridiniumchlorid (CPC)

### a) Die eiweißfreie Fällung

Bei erster Betrachtung schien auch CPC das durch AA mitgefällte Protein wieder auszufällen, jedoch löste sich der Niederschlag bei höheren CPC-Konzentrationen wieder auf, wie aus folgendem Versuch hervorgeht:

Ein in

|                                                                                                                                                                |                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 2 ml NaOH (0,1 n)                                                                                                                                              | gelöster AA-Niederschlag, gewonnen aus 5 ml Plasma wurde mit                    |
| 5 ml Boratpuffer (pH 8,5/0,1 M) und                                                                                                                            |                                                                                 |
| 3 ml H <sub>2</sub> O                                                                                                                                          | auf ein Volumen von 10 ml gebracht. Zu                                          |
| <hr/>                                                                                                                                                          |                                                                                 |
| 2 ml                                                                                                                                                           | davon wurde                                                                     |
| 0,02 ml CPC (5%)                                                                                                                                               | pipettiert, worauf sich eine starke Trübung zeigte, die bei weiterer Zugabe von |
| 0,02 ml CPC (5%)                                                                                                                                               | wieder verschwand. Jetzt noch                                                   |
| zugefügtes Heparin jedoch machte eine bleibende Trübung, die sich abzentrifugieren ließ. Der in NaCl (2M) wieder aufgelöste Niederschlag erwies sich als meta- |                                                                                 |
| chromatisch aktiv und weitgehend eiweißfrei.                                                                                                                   |                                                                                 |

### b) Ausschütteln des CPC mit Chloroform

Als nächstes war zu klären, ob und wie sich CPC aus der wiederaufgelösten Fällung quantitativ entfernen ließ. Die sehr gute Löslichkeit des CPC in Chloroform ließ dieses als das geeignete Mittel zur Entfernung des CPC erscheinen. Als CPC-Nachweis diente seine starke Lichtabsorption im UV, deren Maximum bei 259,3 m $\mu$  liegt. (s. Abb. 5)

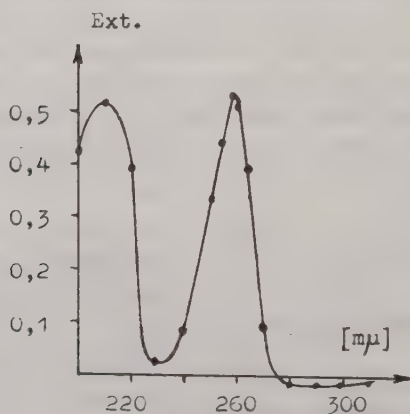


Abb. 5. UV-Absorptionsspektrum  
von CPC

2 ml NaCl 4M                      und  
2 ml CPC 0,1 %                    wurden mit  
4 ml Chloroform                    1 min geschüttelt, danach zur  
raschen Phasentrennung zentrifugiert und das Chloro-  
form mit Stickstoff aus dem Überstand ausgetrieben.

Die Extinktion gegen eine 2 M NaCl Lösung ergab  $E = -0,004$ , während die Extinktion einer Vergleichslösung, die nicht mit Chloroform ausgeschüttelt war,  $E = 0,569$  betrug. Dieses Ergebnis zeigt, daß CPC in der angegebenen Konzentration schon durch einmaliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Chloroform quantitativ aus einer 2 M NaCl Lösung entfernt werden kann.

#### c) Ausschütteln des CPC praesente Heparin

Um sicher zu gehen, daß sich CPC auch in Anwesenheit von Heparin mit Chloroform ausschütteln läßt, wurde der oben beschriebene Versuch mit 1 ml Heparin (5 IE/ml) und 1 ml CPC 0,2 % wiederholt und wieder bei 259,3  $\mu$  die Extinktion gegen eine 2 M NaCl mit einer Kontrolllösung verglichen, wobei sich ergab, daß Heparin das Ausschütteln des CPC nicht behindert.

#### d) Abheben des Heparin von der Chloroformphase

Das Abheben des Heparin von der Chloroformphase bringt einen Volum-Verlust, der insbesondere im Hinblick auf die Bestimmung des endogenen Heparins störend ist. Der Versuch aber, ihn durch mehrmaliges Aufgießen auf den Rest der Wasserphase und Abheben zu umgehen, schlug fehl:

50 IE Heparin,

die mit CPC gefällt, abzentrifugiert und in

2 ml NaCl 2 M

wieder gelöst worden waren, wurden mit

2 ml Chloroform geschüttelt. Die obere Phase wurde abgehoben, mit Wasser wieder aufgefüllt, zentrifugiert, wieder abgehoben usw., bis das Heparin in einem Volumen von

insgesamt 50 ml enthalten war. Davon wurde 1 ml metachromatisch bestimmt und einer Metachromasie gegenübergestellt, die sich ergab, wenn man von der oberen Phase einmalig 1 ml absaugte und auf ein Volumen von 25 ml brachte und davon 1 ml mit Azur bestimmte. Es stellte sich heraus, daß durch das wiederholte Abheben und Wiederauffüllen ein Heparin-Verlust von 13 % gegenüber dem einmaligen Abheben entstand. Wahrscheinlich wäre der Versuch anders ausgefallen, wenn man 2 M NaCl statt Wasser zum Auffüllen verwendet hätte. Nachdem stärkere NaCl-Lösungen aber einerseits den R'ase-Test stören, andererseits das AA ausfällen und so für die weitere Behandlung zu großer Verdünnung zwingen, wäre der Nutzen wohl gering gewesen.

#### e) pH-Optimum der CPC-Fällung

Zur Bestimmung des optimalen Fällungs-pH wurde folgender Versuch angestellt:

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| 1 ml Heparin (50 IE) | wurde mit |
| 1 ml CPC (5%)        | in        |
| 5 ml Puffer          | gefällt.  |

Folgende Puffer wurden verwendet:

|                   |        |         |
|-------------------|--------|---------|
| 1) Acetatpuffer   | 0,1 M  | pH 3,9  |
| 2) "              | 0,1 M  | pH 5,0  |
| 3) "              | 0,1 M  | pH 5,9  |
| 4) Phosphatpuffer | 1/15 M | pH 6,5  |
| 5) Trispuffer     | 0,1 M  | pH 7,13 |
| 6) Boratpuffer    | 0,1 M  | pH 8,5  |

Nach dem Zentrifugieren (15 min bei 30000 rpm) wurde der Niederschlag in

|                 |                                        |
|-----------------|----------------------------------------|
| 2 ml NaCl 2M    | gelöst und mit                         |
| 3 ml Chloroform | ausgeschüttelt. Von der Wasser-        |
|                 | phase wurde                            |
| 1 ml            | abpipettiert, mit                      |
| 24 ml Wasser    | verdünnt und metachromatisch bestimmt. |

Die maximale Ausbeute von 95 % fand sich bei einem Fällungs-pH von 7,13 (s. Abb.6.).

Im Vergleich zu den vorausgegangenen Versuchen, in welchen die CPC-Fällung bei etwa 5000 rpm abzentrifugiert worden war, war diesmal bei 30 000 rpm die Ausbeute um 30 % besser.

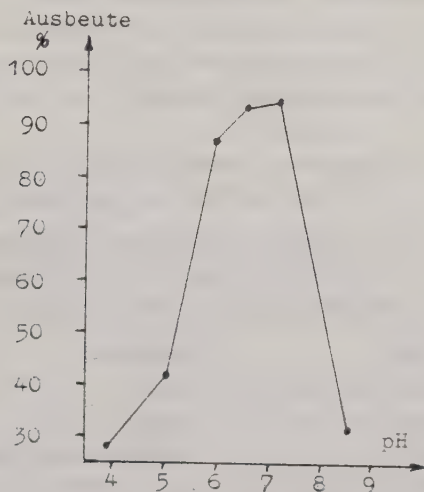


Abb.6. Die pH-Abhängigkeit der CPC-heparinfällung

#### f) Die CPC-AA-Fällung

Da das mit CPC gefällte Heparin in einer 2 M NaCl Lösung wieder gelöst wird, eine solche Salzkonzentration aber den metachromatischen wie auch den R'ase-Hemmtest stört, muß zur Bestimmung kleiner Heparinmengen das NaCl durch eine weitere Fällung eliminiert werden. Als geeignetes Fällungsmittel erschien wieder

AA, das allerdings in höheren Salzkonzentrationen ausfällt. Daher ist man gezwungen die Salzkonzentration vor der AA-Fällung durch Verdünnung herabzusetzen.

aa) AA-Löslichkeit in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration

Zur Feststellung der höchsten Salzkonzentration, bei der eine bestimmte Menge AA eben noch löslich ist, wurde die AA/Salz-Löslichkeitskurve aufgestellt: zu verschiedenen AA-Verdünnungen wurde NaCl-Lösung (2 M und 4 M) pipettiert, bis eine Fällung eintrat. Die jeweilige AA-Konzentration wurde gegen die Molarität der NaCl-Lösung aufgetragen. (s. Abb. 7.)

bb) Die AA-Heparinfällung aus Kochsalzlösungen  
pH-Optimum der Fällung

Im gleichen Zusammenhang interessierte noch die Frage, ob NaCl die Heparinfällung durch AA stört. Sie wurde geklärt durch folgenden Versuch:

|                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 ml Hep (5 IE/ml)               | wurde in                        |
| 1 ml NaCl (0,25 M bis 2M)        | und                             |
| 7 ml Acetatpuffer (pH 5,9/0,1 M) | mit                             |
| 1 ml AA (0,4 %)                  | gefällt und metachromatisch be- |

stimmt. Die Ausbeute war bei den verschiedenen Salzkonzentrationen immer um 100 %.

Mit verschiedenen Puffern wurde auch noch das pH-Optimum der AA-Heparinfällung erprobt. Es liegt bei pH 5,9, wo nach Burger (3) auch das Minimum der Eiweißfällung liegt. (s. Abb. 8.)

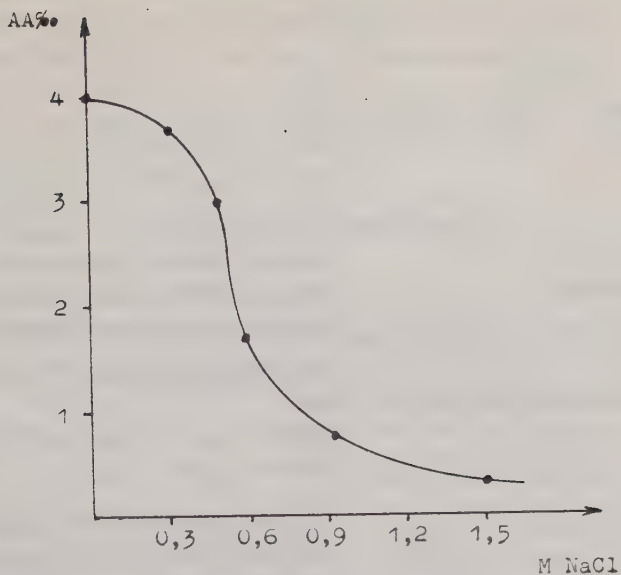


Abb.7. Löslichkeit des AA in Kochsalzlösung

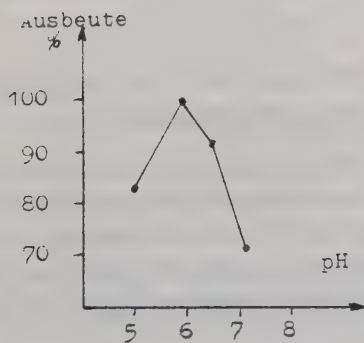


Abb.8. Die pH-Abhängigkeit der AA-Heparinfällung

### cc) Fällungsschema

|                                  |                                         |
|----------------------------------|-----------------------------------------|
| 1 ml Hep (5 IE/ml)               | in                                      |
| 5 ml Trispuffer (pH 7,13/0,1M)   | wurde mit                               |
| 1 ml CPC (5%)                    | gefällt, 15 min bei 30000 rpm           |
|                                  | zentrifugiert und der Nieder-           |
|                                  | schlag in                               |
| <hr/>                            |                                         |
| 2 ml NaCl (2 M)                  | gelöst. Das CPC wurde in                |
| 3 ml Chloroform                  | ausgeschüttelt und zur rascheren        |
|                                  | Phasentrennung zentrifugiert.           |
| <hr/>                            |                                         |
| 1 ml                             | der wässrigen Phase wurde in            |
| 8 ml Acetatpuffer (pH5,9/0,1M)   | mit                                     |
| 1 ml AA (0,4 %)                  | gefällt und 15 min bei 30000 rpm        |
|                                  | zentrifugiert. Das in                   |
| <hr/>                            |                                         |
| 1 ml NaOH (0,1 n)                | gelöste Sediment wurde zur Eli-         |
|                                  | mination des AA 3 Mal ausgeäthert       |
|                                  | und der Äther im Wasserbad bei          |
|                                  | 70° unter strömendem Stickstoff         |
|                                  | ausgetrieben. Mit                       |
| 0,75 ml HCl (0,1 n)              | und                                     |
| 2,25 ml Boratpuffer (pH8,5/0,1M) | wurde neutralisiert.                    |
| <hr/>                            |                                         |
| 2 ml                             | davon wurden mit                        |
| 0,5 ml Azur (20 mg %)            | bei 515 m $\mu$ photometrisch bestimmt. |

Nach diesem Fällungsschema betrug die Ausbeute etwa 93 %.

### g) Die CPC-Heparinfällung in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration

Heparin wurde nach dem oben angegebenen Fällungsschema aus verschiedenen Verdünnungen gefällt, um nachzuprüfen, ob CPC in der Lage ist, auch kleinste Heparinmengen zu fällen, was für den Nachweis endogenen Heparins von Bedeutung ist. Dazu wurde die

CPC-Fällung aus Puffer-Volumina zwischen 1 und 22 ml durchgeführt, so daß 5 IE Heparin aus Gesamtvolumina zwischen 3 und 24 ml, oder anders ausgedrückt in Konzentrationen von ca 12 bis 1,5 $\mu$ g Heparin/ml gefällt wurden. Die Ausbeute war in allen Fällen gleich.

#### n) Die Dreifach-Fällung: AA-CPC-AA

Aus dem Plasma fällt CPC Eiweiß, das weder salz- noch laugenlöslich ist, noch auch das Heparin freigibt. Daher muß man in die CPC-Fällung ein durch AA-Fällung aus dem Plasma gewonnenes Heparin einsetzen: Das NaOH-Hydrolysat des AA-Heparinats mit dem gelösten Eiweiß wird mit HCl neutralisiert und dann mit CPC gefällt.

Während die Wiedergewinnung aus Wasser nach diesem Schema stets über 90 % betrug, wobei sich die Verluste so auf die einzelnen Fällungsschritte verteilten, daß:

- die 1. (AA) Fällung mit 2,0 %,
- die 2. (CPC) " mit 6,2 %,
- die 3. (AA) " mit 0 %

darin beteiligt waren, konnten anfangs aus dem Plasma nur etwa 40 % der eingesetzten Heparinmenge (5 IE/5 ml Plasma) wieder gefunden werden. Wartete man bei jeder Fällung vor dem Zentrifugieren 30 min, um dem Niederschlag Zeit zu geben sich dichter zusammenzuballen, so konnte man bis zu 75 % wiedergewinnen. Dabei fielen auf

- die 1. (AA) Fällung 1,9 % Verlust
- die 2. (CPC) " 16,5 % "
- das Waschen mit Chloroform 4 % " und auf
- die 3. (AA) Fällung 2,6 % Verlust.

Weitere Versuche lehrten, daß sich die Ausbeute weiter verbessern ließ, wenn man nicht erst gele-

gentlich der CPC Elimination, sondern schon nach der ersten (AA) Fällung mit Chloroform einen Teil des Proteins herausfällte. Gleichzeitig stellte sich heraus, daß man die Verluste an der zweiten Chloroformausschüttelung verringern konnte, wenn man vorher alkalisierte. — Ein Versuch, bei dem Proben in verschiedenen Phasen herausgenommen wurden und erst nach einer Unterbrechung von 10 Stunden weiterbehandelt wurden, zeigte, daß man den ganzen Fällungsgang möglichst ununterbrochen durchführen muß, wenn man nicht Gefahr laufen will, durch Bakterienwachstum Heparin zu verlieren.

#### i) Genaue Beschreibung der Isolation in Plasma eingesetzten Heparins

Man pipettiert nacheinander in einen Zentrifugenbecher 5 ml Oxalatplasma (1 ml K-Oxalat 30 % auf 100 ml Blut), 10 ml Acetatpuffer ( pH 5,9/0,5 M ), 1 ml Heparin (5 IE/ml) und 3 ml Aminoacridin (0,4 %). Man schwenkt den Becher zur besseren Durchmischung vorsichtig und läßt das Ganze 1/2 Std. stehen. Danach wird in der Ultrazentrifuge 30 min bei 30 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Der gelbliche, homogene, klebrige Niederschlag am Becherboden wird mit 2 ml Natronlauge (0,1 n) aufgerührt, - wobei auch die Becherwände sorgfältig gespült werden, um unsichtbar daran haftende Teile des Praecipitates mit aufzulösen - danach in ein kleines Zentrifugenglas überführt und der Becher mit 1 ml Aqua dest. nachgespült. Man entfernt das Fällungsmittel mit Äther, indem man Äther aufgießt, mit einem Glasstab heftig mischt (eventuell auftretende Emulsionen können durch weitere Zugabe von Äther rasch geklärt werden) und den Äther absaugt. Dies wiederholt man so oft, bis die Ätherphase nicht mehr gelb gefärbt ist, was meist schon nach dreimaligem Extrahieren eintritt. Der restliche

Äther wird im Wasserbad bei 80°C unter strömendem Stickstoff ausgetrieben. Nach dem Abkühlen schüttelt man zur Verringerung des mitgefällten Eiweißes mit Chloroform aus, wobei sich eine milchige Emulsion bildet, die in der Zentrifuge bei 5000 rpm schnell in eine klare wässrige Phase, eine leicht trübe Chloroformphase und eine weiße Zwischenschicht von gefällttem Protein getrennt wird. Von der wässrigen Phase entnimmt man 2,5 ml, die zu 5 ml Phosphatpuffer (pH 7,13/<sup>11</sup>/<sub>15</sub>) in einen Zentrifugenbecher gegeben werden; man neutralisiert mit 1 ml Salzsäure (0,1 n) und fällt mit 1 ml Cetyl-Pyridiniumchlorid (5 %). Nach einer halben Stunde wird abermals in der Ultrazentrifuge 30 min bei 30 000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und der im Metallbecher unsichtbare Niederschlag durch längeres Schwenken mit 2 ml einer Lösung von Kochsalz (2 M) in Natronlauge (0,02 n) gelöst. Man bringt den gelösten Niederschlag wieder in ein kleines Zentrifugenglas, spült den Becher mit 0,5 ml der oben angegebenen Lösungsflüssigkeit nach und entfernt das CPC durch Ausschütteln mit Chloroform. Es wird wie oben zentrifugiert und von der wässrigen Phase 2 ml entnommen, die ein drittes Mal in den grossen Zentrifugenbechern mit 15 ml Acetatpuffer (pH 5,9/0,1 M) und 2 ml AA (0,4 %) gefällt und, wie schon beschrieben, zentrifugiert werden. Danach wird der unsichtbare Niederschlag wieder in 2 ml Natronlauge (0,1 n) gelöst, das Aminoacridin ausgeäthert, mit 1,5 ml Salzsäure (0,1 n) neutralisiert und ad 5 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Durch das Ausschütteln mit Chloroform verliert man beim ersten Mal  $\frac{1}{6}$  und beim zweiten Mal  $\frac{1}{5}$  des Volumens, so daß man am Schluß bestenfalls  $\frac{5}{6} \cdot \frac{4}{5} = \frac{2}{3}$  der eingesetzten Heparinmenge erhält. 1 ml des nach dem angegebenen Verfahren aus Plasma gewonnenen Präparates kann bei einem Einsatz von

5 IE Heparin also nur 0,66 IE enthalten, eine Menge, die mit der metachromatischen Methode noch gut erfaßbar ist: man nimmt, nachdem man sich eine Eichkurve angefertigt hat

1 ml des Präparates aus Plasma

1 ml Boratpuffer (pH 8,5/0,1 M) und

0,5 ml Azur (20 mg %),

mischt die Reagenzien in einer Kuvette und liest die Extinktion gegen einen Leerwert, der anstelle des Heparins Wasser enthält, bei einer Wellenlänge von 515 m $\mu$  ab.

Zur Bestimmung mit dem R'ase-Test kann man das Präparat noch einmal im Verhältnis 1:5 bis 1:10 mit Aqua dest. verdünnen. Die Eichkurve muß, wie erwähnt (II,ob), mit der gleichen Salzkonzentration aufgestellt werden, die auch im Bestimmungsansatz herrscht. Dann liefern R'ase-Test und metachromatische Bestimmung gleiche Ergebnisse für aus dem Plasma isoliertes Heparin, d.h. die Metachromasiemethode zeigt gegenüber dem R'ase-Test, wie auch schon bei direkt getestetem Heparin-Liquemin, um 5 bis 10 % niedrigere Werte an.

Wenn auch die Wiedergewinnung aus Plasma nach der beschriebenen Fällungsmethode wenigstens 20 % betrug, wobei sich die Verluste etwa folgendermaßen verteilten:

1. Fällung 1 %

1. Chloroform 2 %

2. Fällung 12 %

2. Chloroform 0 %

3. Fällung 5 %,

so ist die Ausbeute doch im Ganzen schwankend und offenbar auch von der Qualität des Plasmas abhängig. Damit erscheint die Methode, jedenfalls in dieser Form, nicht geeignet, absolute quantitative Aussagen über endogenes Heparin zu machen; qualitative und begrenzende quantitative Aussagen erlaubt sie jedoch sehr wohl.

k) Schema der Isolation in Plasma eingesetzten Heparins

|                                                |                                                                                      |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 ml Plasma                                    |                                                                                      |
| 0 ml Acetatpuffer (pH 5,9/0,5 M)               |                                                                                      |
| 1 ml Heparin                                   |                                                                                      |
| 3 ml AA                                        | zentrifugieren (30 min/30000 rpm).<br>Niederschlag mit                               |
| <hr/>                                          |                                                                                      |
| 2 ml NaOH 0,1 n                                | lösen, in kleines Zentrifugen-                                                       |
| 1 ml H <sub>2</sub> O                          | glas gießen, mit                                                                     |
| 5 ml Chloroform                                | nachspülen, 3 Mal ausäthern, mit<br>ausschütteln und bei 5000 rpm<br>zentrifugieren. |
| <hr/>                                          |                                                                                      |
| 5 ml                                           | Von der wässrigen Phase                                                              |
| 5 ml Phosphatpuffer (pH 7,13/ $\frac{M}{15}$ ) | abheben, dazu                                                                        |
| 1 ml HCl (0,1 n)                               |                                                                                      |
| 1 ml CPC (5 %)                                 | zentrifugieren (30 min/30000 rpm).<br>Niederschlag in                                |
| <hr/>                                          |                                                                                      |
| 2 ml NaCl + NaOH (2M/0,02 n)                   | lösen, in kleines Zentrifugenglas                                                    |
| 5 ml NaCl + NaOH (2M/0,02 n)                   | gießen und mit                                                                       |
| 5 ml Chloroform                                | nachspülen. Ausschütteln mit<br>Von der wässrigen Phase                              |
| <hr/>                                          |                                                                                      |
| 2 ml                                           | abheben, dazu                                                                        |
| 5 ml Acetatpuffer (pH 5,9/0,1 M)               |                                                                                      |
| 2 ml AA (0,4 %)                                | zentrifugieren (30 min/30000 rpm).<br>Niederschlag in                                |
| <hr/>                                          |                                                                                      |
| 2 ml NaOH (0,1 n)                              | lösen, ausäthern und mit                                                             |
| 5 ml HCl (0,1 n)                               | neutralisieren, mit Aqua dest.<br>auffüllen ad                                       |
| 5 ml                                           | zum Metachromasietest oder ad                                                        |
| 0 ml                                           | zum R'-ase-Test.                                                                     |

#### IV. Endogenes Heparin

##### 1. Der Anreicherungsversuch

Zur Klärung der Frage nach endogenem Heparin mußte Heparin aus einem größeren Plasmavolumen angereichert werden. Dazu wurden aus 160 ml Plasma 16 Mal 10 ml Plasma mit je 10 ml Acetatpuffer und 6 ml AA gefällt. Der Niederschlag wurde in 0,1 n NaOH gelöst und die Becher nachgespült, so daß Heparin aus 160 ml Plasma schließlich in einem Volumen von 27 ml gelöst war. In einem Schüttelzylinder wurde das AA mit Äther eluiert und anschließend ein Teil des Eiweißes mit Chloroform gefällt. Die entstandene milchige Emulsion wurde zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 19,8 ml ( $\hat{=}$  73,4 % des Ausgangsvolumens) abgetrennt, mit 1,5 ml 1n HCl neutralisiert und mit Phosphatpuffer auf ein Vol. von 100 gebracht. Das Präparat wurde in vier Bechergläser verteilt und mit je 5 ml CPC gefällt und danach in insgesamt 5 ml NaCl + NaOH wieder gelöst. CPC wurde wieder mit Chloroform entfernt, die verbliebenen 4,7 ml ( $\hat{=}$  69 % vom gesamten Ausgangsmaterial) wurden in zwei Bechergläser aufgeteilt und in 2 Mal 15 ml Acetatpuffer mit 2 Mal 2 ml AA gefällt. Die Niederschläge wurden in insgesamt 2 ml 0,1n NaOH gelöst, mit 0,15 ml HCl 1n neutralisiert und auf ein Vol von 3,5 ml gebracht. Diese 3,5 ml repräsentierten 69 % des aus 160 ml Plasma gewonnenen Heparins, so daß 1 ml davon das Heparin aus 31,5 ml Plasma enthielt. 1 ml des Präparates wurde auf die beschriebene Weise dem R'ase-Test unterzogen, wobei sich eine Nennung ergab, die 2,37 $\gamma$  Heparin entsprach.

0,5 ml des Präparates wurden mit HCl angesäuert auf eine Säurekonzentration von 0,015 n und bei 80°C 30 min im Wasserbad hydrolisiert. Dabei sollte das Heparin zerstört werden, nicht aber die übrigen Mucopolysaccharide. Nach der Neutralisation mit NaOH wurde das

Volumen auf 1,5 ml gebracht und der R'ase-Test durchgeführt, der - umgerechnet - diesmal eine 5fach höhere Hemmung ergab, während der nur verdünnte, aber nicht hydrolysierte Vergleichswert umgerechnet nur noch die halbe Hemmung aufwies. Damit wurde klar, daß die gemessene Hemmung im R'ase-Test nicht, oder nicht allein vom Heparin herrühren konnte, da doch der Hemmungseffekt nach Säurehydrolyse des Heparins hätte abnehmen müssen.

Nach dem R'ase-Test wurde das Präparat nach der Biuret-Methode quantitativ auf Eiweiß untersucht. Dabei ergab sich, daß die Eiweißkonzentration, wenn man auf das Plasma-Ausgangsvolumen bezog und die Volum-Verluste mit einberechnete, noch etwa 0,6 mg % betrug, was einer Heparinanreicherung im Verhältnis zum Eiweiß von  $10^4:1$  entspricht.

## 2. Der ungeklärte Störeffekt

Bei einem Kontrollversuch, der im ganzen wie der vorausgegangene angelegt war, wurde die ganze Fällungsprozedur mit 120 ml Aqua bidest., anstelle von Blutplasma durchgeführt. Es ergab sich, daß nach Verdünnung des Präparates mit Wasser die Hemmung stärker abnahm, als der Verdünnung entsprach und daß nach Säurehydrolyse und Neutralisation die Hemmung wieder zunahm. Dieser paradoxe Effekt konnte durch einen Versuch, bei dem der Fällungsgang von rückwärts getestet wurde, als Kochsalzwirkung teilweise aufgeklärt werden (s.II/ob).

Die Abnahme von  $\frac{AN}{\Delta t}$  nach Säurehydrolyse mit anschließender Neutralisation war beim Anreicherungsversuch aber deutlich größer, als sich aus der Erhöhung der Salzkonzentration erklären läßt. Daraus ist zu schließen, daß irgendeine Substanz, die wegen der Zunahme ihrer R'ase-Hemmwirkung nach Säurehydrolyse nicht Heparin sein kann, eingeschleppt wird und das Ergebnis in Richtung auf zu hohe Werte verfälscht. Um die Salzkonzentration an sich möglichst gering zu halten, wurde in den folgenden Ver-

suchen das AA-Heparinat aus dem letzten Fällungsschritt mit 12,5 prozentiger Ammoniak-Lösung gelöst und danach Ammoniak im Wasserbad bei 80°C unter strömendem Stickstoff ausgetrieben.

### 3. Die Ausbeute beim Anreicherungsverfahren

Im folgenden wurde noch die Wiedergewinnung beim Konzentrierungsversuch geprüft und zu diesem Zweck in 60 ml Plasma 10  $\gamma$  und 100  $\gamma$  Heparin eingesetzt und wie beschrieben angereichert. Beim R'ase-Test ergab sich für den Versuch mit 0,16  $\gamma$  Heparin/ml Plasma eine Ausbeute von 73 %; für den Versuch mit der 10-fachen Heparinmenge eine Ausbeute von 60 %. Das zeigt noch einmal, daß die Ausbeute von der Heparinkonzentration unabhängig ist und daß sie ausreicht, um begrenzende quantitative Aussagen über endogenes Heparin zu machen.

### 4. Endogenes Heparin

Bei drei weiteren Versuchen, in welchen aus je 120 ml Plasma Heparin auf die beschriebene Weise isoliert und getestet wurde, ergaben sich Hemmeffekte, die bei einer zugrunde gelegten Ausbeute von 60 %, einer Heparinkonzentration von 0,047  $\gamma$ ; 0,053  $\gamma$  und 0,027  $\gamma$  Heparin/ml Plasma entsprachen. Die Konzentration eines freien endogenen Heparins kann also nicht größer sein als etwa 0,05  $\gamma$ /ml Plasma. Wegen der Verfälschung dieses Ergebnisses durch den beschriebenen, ungeklärten Störeffekt ist es aber sicher in Wirklichkeit noch weniger, wenn man nicht annehmen will, daß endogenes Heparin im normalen menschlichen Plasma überhaupt nicht vorkommt.

Zum mindesten erlaubt dieses Ergebnis die Aussage,

das freies Heparin im Blut bezüglich seiner heute bekannten biologischen Wirkungen keine wirksame Konzentration erreicht und somit keinen Hormoncharakter trägt, denn für die antikoagulatorische Wirksamkeit ist eine Mindestkonzentration von  $1\gamma/\text{ml}$ , für die antilipämische eine solche von  $0,1\gamma/\text{ml}$  erforderlich.

#### V. Diskussion

Mit der beschriebenen Methode konnte freies endogenes Heparin im Plasma nicht nachgewiesen werden, jedoch die Existenz eines solchen bis zu einer Konzentration von  $0,05\gamma$  Heparin/ml Plasma sicher ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Arbeiten von Jaques und Bell (4), Zöllner und Burger und Braun (7), Monkhouse und Jaques (8). Zu widersprechenden Ergebnissen gelangten Eiber und Danisnefsky (9), die aber Vollblut von Hunden untersuchten und Engelberg (10), der nach einer für Heparin unspezifischen Fällung mit Methanol-Aceton schließlich aus der wiederum unspezifischen gerinnungsnennenden Aktivität seines Präparates auf die Anwesenheit und Menge endogenen Heparins schließt.

Die postulierte Funktion des Heparins als wichtigster Baustein im antikoagulatorischen System des Blutes ist aber gar nicht an die Existenz eines freien endogenen Heparins im Plasma gebunden. Vorstellbar wäre auch der zelluläre Transport des Heparins zum Ort seiner Wirkung. Möglicherweise ist aber die Heparinkonzentration des Gewebes viel ausschlaggebender für die physiologische Gerinnungsnennung als freies oder gebundenes Heparin im Blut.

## VI. Zusammenfassung

Es wurde ein Verfahren ausgearbeitet, um kleinste Heparinmengen nahezu völlig eiweißfrei aus menschlichem Plasma darzustellen. Dies gelang durch eine mehrfache Heparinfällung mit zwei verschiedenen Reagenzien (Aminoacridin und Cetyl-Pyridiniumchlorid), welche nicht dieselbe Eiweißfraktion mitfällen und durch eine dazwischengeschaltete Eiweißfällung an der Grenzschicht mit Chloroform.

Die Eiweißkonzentration des Präparates beträgt noch ca 0,80 mg %, das ist etwa das  $10^{-4}$ -fache der Plasma-Eiweißkonzentration. Die Wiedergewinnung kleinster Heparinmengen aus dem Plasma betrug für den normalen Fällungsgang in vielfachen Versuchen über 80 %, für das Anreicherungsverfahren zur Suche nach endogenem Heparin in Einzelversuchen 60 % bis 70 % des eingesetzten Heparins.

Zur quantitativen Bestimmung des Heparins diente der sehr spezifische Ribonuclease-Hemmtest. Er wurde für die spektrophotometrische Messung so verfeinert und die Meßanordnung so eingerichtet, daß es gelang, noch 0,2  $\gamma$  Heparin/ml mit einer Änderung des Meßeffektes von 10 % signifikant nachzuweisen.

Mit einem Anreicherungsverfahren aus einem größeren Plasmavolumen wurde versucht, endogenes Heparin aus dem Plasma zu gewinnen. Auf Grund eines ungeklärten Störeffektes, der sicher nicht auf Heparin beruht, konnte nur nachgewiesen werden, daß es nicht mehr als 0,05  $\gamma$  freies endogenes Heparin im Plasma geben kann. Daraus ergibt sich, daß allfälliges endogenes Heparin im Blut bezüglich seiner bekannten biologischen Wirkungen, der antikoagulatorischen und der antilipämischen, keine wirksame Konzentration erreicht. Darüberhinaus wurde wahrscheinlich gemacht, daß die Menge des endogenen Heparins - wenn ein solches im

normalen menschlichen Plasma überhaupt vorkommt -  
noch unter der mit 0,05 $\gamma$ /ml als oberste Grenze ange-  
gebenen liegt.

## VII. Reagenzien

### 5-Aminoacridin-hydrochlorid

0,4 % wässrige Lösung.

Handelspräparat der Firma Serva Heidelberg.

### Azur A

20 mg % wässrige Lösung.

Handelspräparat der Firma Dr. Th. Schuchardt,  
München.

### Bruzin

10 g Bruzin in 50 ml 95 % warmen Äthylalkohols  
lösen, mit 14 ml 10 % Phosphorsäure umsetzen und  
langsam abdampfen. Die entstandenen Kristalle in  
Aqua dest. als 5 % Lösung wieder auflösen.

### Cetyl-pyridiniumchlorid

5 % wässrige Lösung.

Handelspräparat der Firma Dr. Th. Schuchardt,  
München.

### Cyclisches Cytidinphosphat und

### Cyclisches Uridinphosphat

Die Nucleosidphosphate werden als Bariumsalz ge-  
liefert und müssen, da Barium - wie alle Schwer-  
metalle - die Ribonuclease hemmt, mit der ent-  
sprechenden Menge Kaliumsulfat zum Kaliumsalz um-  
gesetzt werden. Die Lösung wird wegen der besseren  
Haltbarkeit in doppelter Konzentration angesetzt  
und zum Gebrauch mit Aqua bidest. auf 0,3 mg/ml  
verdünnt.

### Heparin

Ampullen á 5 ml, 5000 IE/ml. Heparin-Liquemin.  
Handelspräparat der Firma Hoffmann-La Roche AG.

### n-Octylamin

7 ml n-Octylamin werden mit 7 ml Aqua dest. und  
3,4 ml konz. Salzsäure versetzt. Nach Lösung des

n-Octylamin mit Aqua dest. ad 100,0 auffüllen.  
(pH zwischen 7,0 und 8,5)

### Pronase

Breitspektrumprotease. Wässrige Lösung von 25 PU  
(proteolytic units) pro ml.

Handelspräparat der Firma California Corporation  
for Biochemical Research. Los Angeles, California.

### Ribonuclease

120  $\gamma$ /ml gelöst in Aqua bidest. mit einem Zusatz  
von 2,5 mg Ä.D.T.E. auf 10 ml (Äthylendiamin-  
tetraessigsäure-dinatrium) zur Bindung der Schwer-  
metallionen.

Handelspräparat der Firma Serva, Heidelberg.

### Ribonucleinsäure

0,5 mg/ml gelöst in Acetatpuffer pH 5,9/0,1 M.

Vor Gebrauch 1:2 bis 1:4 mit Puffer verdünnen.

Aus Hefe gewonnenes Handelspräparat der Firma  
Dr. Th. Schuchardt, München.

### Tris-Puffer

pH 7,15/0,1 M

3,285 g 2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1'3'diol

1,572 g Natriumchlorid

23,055 mmol Salzsäure, gelöst in 250 ml Aqua bidest.

### VIII. Schrifttum

- (1) N. Zöllner u. B. Lorenz: H.U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S. 79, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962.
- (2) G. Hobom u. N. Zöllner: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 335, 117 (1964).
- (3) Ch. Burger: Dissertation Univ. München 1962.
- (4) L.B. Jaques u. H.I. Bell: Methods biochem. Analysis 7, 253 (1959).
- (5) H. Gibian: Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen. O. Hoffmann - Osterhof, Einzeldarstellungen aus dem Ges. Gebiet der Biochem., Wien, 4, 39 (1959).
- (6) I.A. Cifonelli u. A. Dorfmann: J. Biol. Chem. 235, 11, (1960).
- (7) N. Zöllner u. Ch. Burger u. R. Braun: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 329, 76 (1962)
- (8) F.C. Monkhouse u. L.B. Jaques: J. Laborat. Clin. Med. 36 (1950).
- (9) H.B. Eiber u. I. Danishefsky: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94, 801 (1957).
- (10) H. Engelberg: Heparin. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA (1963).

Herrn Professor Dr. Nepomuk Zöllner danke ich herzlich für die Überlassung dieses nochinteressanten Themas, für die wertvollen Ratschläge und Anregungen bei der Durchführung der Arbeit und für die Unterstützung bei ihrer Niederschrift.

## Lebenslauf

Ich, Kurt Winkler, wurde am 29. 4. 1938 als zweiter Sohn des Dr. Ernst Winkler und seiner Ehefrau Therese, geb. Hilble, beide Lehrer für Mathematik und Physik an der höheren Schule, in Pullach bei München geboren. Von 1944 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Gräfelfing bei München und danach das Realgymnasium Gräfelfing, wo ich im Juni 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Abitur wandte ich mich zunächst dem Maschinenbau zu und studierte zwei Semester an der Technischen Hochschule in München. Da mich dieses Studium nicht befriedigte, wechselte ich an die Universität München und immatrikulierte mich, einem Herzenswunsche folgend, im Herbst 1958 für das Studium der Medizin.

Im Juli 1959 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung mit der Note 1,0 und im April 1960 wurde ich in die Studienstiftung des Deutschen Volkes aufgenommen, der ich seither angehöre. Nach dem 5. vorklinischen Semester, im Februar 1961, legte ich die ärztliche Vorprüfung mit der Gesamtnote "gut" ab. Von August 1961 bis Juni 1963 arbeitete ich im Staublungenlabor der medizinischen Universitätspoliklinik in München an meiner Dissertation und im Januar 1965 beendete ich das medizinische Staatsexamen in München mit der Note "sehr gut".







